

Enhanced Stemness and Bone Regeneration Ability of Mesenchymal Stem Cell Spheroids by Shaking Culture with Neural Stem Cell Medium

著者	大堀 悠美
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第19783号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00133177

論文内容要旨

学籍番号 B7DD1007

氏名 大堀 悠美

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) は高い自己複製能と多分化能, 免疫制御能を有しており, 再生医療における幹細胞療法の細胞源として注目されている. しかしながら接着継代培養を繰り返した MSC (高継代 MSC) は遺伝子発現が変化し, 多分化能が低下することが問題となっている. 我々の研究グループは, 従来の接着培養法に代わり MSC の幹細胞性を安定して維持する新規培養方法を探索し, MSC 維持培地 (GW 培地) を用いた 3 次元振盪培養法を開発した (Niibe K., Ohori-Morita Y., et al. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2020). この培養方法で形成された細胞塊 (GW スフェア) は, 高継代 MSC の多分化能を安定して維持・回復することを報告した. しかしながら GW スフェアは遺伝子発現の回復が不十分であり, さらなる培養条件の最適化が必要であると考えた.

そこで本研究では, 骨髄 MSC (BM-MSC) が中胚葉由来の細胞に加え, 神経堤幹細胞由来の細胞が含まれているという報告に着目した. GW 培地に代わり神経堤幹細胞・神経幹細胞を培養する際に用いる神経幹細胞用培地 (Neu 培地) を用いてヒト BM-MSC の振盪培養を行い, 形成したスフェアの *in vitro* および *in vivo* 解析を行った. *in vitro* 解析では過去の報告同様, 接着高継代 MSC は細胞老化を示し多分化能が低下したが, 驚くべきことに高継代 MSC から形成された Neu スフェアは細胞生存率が高く, 3 週間の振盪を加えても MSC・神経堤・幹細胞マーカーを高発現し, 接着培養では低下していた多分化能の回復を認めた. これらの結果より, Neu 培地を用いた振盪培養法で形成された Neu スフェアは, 未分化性の高い状態を維持していることが示唆された.

さらにラット大腿骨欠損モデルを用いた *in vivo* 実験により, Neu スフェアの骨再生能を検討した. 高継代 MSC と高継代 MSC から形成した GW スフェアおよび Neu スフェアをコラーゲンスポンジで包埋し, ラット大腿骨欠損部へと移植し, 術後 3 週間で骨治癒状態を解析した. 高継代 MSC と GW スフェアを移植した群においては骨治癒が不十分であった一方, Neu スフェアを移植した群においては新生骨により欠損部がふさがれ, 他の群と比較をして有意に高い骨密度を有していることが示された. H & E 染色からは, 他群に比べて骨治癒のスピードが亢進していることが示唆された. 過去の報告では, MSC の移植による骨再生においては, 欠損部周囲の免疫制御が重要であることが示唆されている. 3 次元形成されたスフェアは接着細胞と比較して傍分泌能等も上昇しているとの報告もあり, 我々の Neu スフェアも高い免疫関連マーカーを発現していたことから, 他の細胞群と比較して Neu スフェアの骨治癒能が向上したことが示唆された.

これらの結果より, Neu 培地を用いた 3 次元振盪培養法で形成された Neu スフェアは *in vitro* 実験で高い未分化性を維持しており, *in vivo* 実験で骨再生を誘導することが示された. この新規培養法は幹細胞を用いた骨再生療法を効果的に実現する有望な方策である可能性が示唆された.

(1171/1200)